

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/FI04/000759

International filing date: 13 December 2004 (13.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FI
Number: 20031818
Filing date: 11 December 2003 (11.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 02 February 2005 (02.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

Helsinki 24.1.2005

ETUOIKEUSTODISTUS
PRIORITY DOCUMENT



Hakija
Applicant

Valtion teknillinen tutkimuskeskus
Espoo

Patenttihakemus nro
Patent application no

20031818

Tekemispäivä
Filing date

11.12.2003

Kansainvälinen luokka
International class

D21C

Keksinnön nimitys
Title of invention

"Menetelmä mekaanisen massan valmistamiseksi"

Täten todistetaan, että oheiset asiakirjat ovat tarkkoja jäljennöksiä Patentti- ja rekisterihallitukselle alkuaan annetuista selityksestä, patenttivaatimuksista ja tiivistelmästä.

This is to certify that the annexed documents are true copies of the description, claims and abstract, originally filed with the Finnish Patent Office.

Marketta Tehikoski
Apulaistarkastaja

Maksu 50 €
Fee 50 EUR

Maksu perustuu kauppa- ja teollisuusministeriön antamaan asetukseen 1027/2001 Patentti- ja rekisterihallituksen maksullisista suoritteista muutoksineen.

The fee is based on the Decree with amendments of the Ministry of Trade and Industry No. 1027/2001 concerning the chargeable services of the National Board of Patents and Registration of Finland.

Osoite:	Arkadiankatu 6 A	Puhelin:	09 6939 500	Telefax:	09 6939 5328
	P.O.Box 1160	Telephone:	+ 358 9 6939 500	Telefax:	+ 358 9 6939 5328
	FIN-00101 Helsinki, FINLAND				

Menetelmä mekaanisen massan valmistamiseksi

Esillä olevan keksinnön kohteena on menetelmä mekaanisen massan valmistamiseksi patenttivaatimuksen 1 johdannon mukaisesti. Keksintö koskee myös menetelmää puu-
 5 hakkeen hiertämiseen perustuvan mekaanisen massanvalmistuksen energiankulutuksen vähentämiseksi patenttivaatimuksen 17 johdannon mukaisesti.

Kemiallisilla ja mekaanisilla massoilla on erilaiset kemialliset ja kuitutekniset ominaisuudet ja siten niiden käyttökohteet paperinvalmistuksessa voidaan valita näiden
 10 ominaisuuksien perusteella. Monet paperilaadut sisältävät kumpaakin massatyyppiä vaihtelevissa suhteissa haluttujen lopputuoteominaisuuksien mukaan. Mekaanista massaa käytetään tarvittaessa parantamaan/ lisäämään tuotteen jäykkyyttä, tilavuusmassaa (bulkkiä) tai optisia ominaisuuksia.

15 Paperin valmistamista varten on puumateriaalin kuidut ensin erotettava toisistaan. Mekaanisessa massanvalmistuksessa käytetään pääasiassa hionta- tai hierremenetelmiä, joissa puuraaka-aine altistetaan jaksoittaisten painepulssien alaiseksi. Kitkalämmön vaikutuksesta puurakenne pehmenee ja sen rakenne höllentyy, mikä lopulta johtaa kuitujen eroamiseen toisistaan (Virkola, 1983). Kuitenkin vain pieni osa systeemiin tuodusta
 20 energiasta kuluu kuitujen irrottamiseen toisistaan; valtaosa muuttuu lämmöksi. Tästä syystä kuidutuksen kokonaisenergiatalous on hyvin huono.

Tunnetussa tekniikassa on ehdotettu erilaisia ratkaisuja mekaanisen massanvalmistuksen energiatalouden parantamiseksi. Eräät näistä perustuvat hakkeen esikäsittelyyn esim.
 25 vedellä tai hapolla (FI-patenttijulkaisut 74493 ja 87371). Tunnetaan myös menetelmiä, joissa kuidutettavaa ainesta käsitellään entsyymeillä kuidutusenergian vähentämiseksi. FI-patenttihakemuksessa 895676 on kuvattu koe, jossa kertaalleen jauhettua massaa käsiteltiin ksylanaasientsyymillä. Tämän entsyymikäsittelyn on esitetty jossain määrin vähentävän kuidutuksen energiankulutusta. Julkaisussa mainitaan myös mahdollisuus käyttää sellu-
 30 laaseja, mutta niistä ei ole annettu esimerkkejä eikä niiden vaikutusta ole osoitettu. Eristettyjen entsyymien osalta kiinnostus on hemisellulaasien lisäksi kohdistunut ligniiniin vaikuttaviin entsyymeihin, mm. lakkaasientsyymiin (Jokinen ja Savolainen, 1991). Lakkaasikäsittelyllä ei kuitenkaan todettu vaikutusta energiankulutukseen (Jokinen ja Savolainen, 1991).

Patenttijulkaisussa EP 0429 422 on ehdotettu lakkaasikäsittelyä mekaanista massaa valmistettaessa ensimmäisen ja toisen jauhatuskäsittelyn välissä. Lakkaasikäsittelyn on esitetty tässä julkaisussa pienentävän jauhatuskäsittelyn energiankulutusta. Patenttijulkaisussa WO 93/23606 on puolestaan ehdotettu käsittelyä fenolioksidaasientsyymeillä viimeisen jauha-

5 tus- tai hienonnuskäsittelyn jälkeen. Mainitulla käsittelyllä ei ollut vaikutusta jauhatuskäsittelyn energiankulutukseen, mutta sillä on esitetty olevan vaikutusta paperin tai kartongin lujuuteen.

10 Koska kuidutuksessa energiaa sitoutuu lähinnä vain kuituaineksen amorfiseen osaan, eli hemiselluloosaan ja ligniiniin, raaka-aineen amorfisuuden lisäys parantaa kuidutuksen energiataloutta. Patenttijulkaisuissa WO 94/20666 ja WO 94/20667 on ehdotettu raaka-aineen amorfisuuden korottamista mekaanisen massan valmistuksen yhteydessä käsittelemällä kuidutettavaa materiaalia sopivalla entsyymillä, joka reagoi raaka-aineen kiteisen,

15 liukenemattoman selluloosan kanssa. Patenttihakemuksessa WO 94/20666 on ehdotettu, että kuidutettava aine käsitellään sellaisella entsyymivalmisteella, jonka pääasiallinen sellulaasiaktiivisuus koostuu sellobiohydraasi-aktiivisuudesta. Patenttihakemuksessa WO 94/20667 ehdotetaan samaan tarkoitukseen käytettäväksi entsyymivalmistetta, joka sisältää sellobiohydraasiaktiivisuutta ja mannanaasiaktiivisuutta. Mainittujen julkaisujen

20 esimerkeissä käsiteltiin karkeaa puuainesta kuten fraktioidun TMP-kuusimassan pitkäkuitujaetta, kertaalleen jauhettuja TMP-kuusimassoja (freeness-arvot CSF 450 - 550) tai eri freeness tasoille jauhettuja TMP-massoja (30 -300). Jos mekaanisen massan valmistuksen yhteydessä käytettiin synergistisesti toimivaa sellulaasientsyymituotetta eli sellulaasia, joka sisältää sekä sellobiohydraasia että endoglukanaasia, johti käsittely

25 liukenemattoman selluloosan hydrolysoitumiseen ja siten massan lujuusominaisuuksien heikkenemiseen.

Patenttijulkaisussa US 6,267,841 on kuvattu termomekaanisen massan valmistusmenetelmä, jossa massalle on tehty entsyymikäsittely ensimmäisen ja toisen hiertä-

30 miskäsittelyn välissä. Myös hakkeen käsittelyä entsyymeillä ennen ensimmäistä hiertämistä on ehdotettu. Entsyymeistä mainitaan pektinaasi, ksylanaasi, lakkaasi, sellulaasi tai näiden seokset. Julkaisussa ei anneta mitään lukuarvoja saavutetusta energiansäästöstä.

Edellä mainittujen eristettyjen entsyymien lisäksi on myös tutkittu kasvavien valkolahottajasiementen hyväksikäyttöä mekaanisen massan valmistuksessa. Tällaisen ennen kuidutusta suoritettun valkolahottajasiementikäsittelyn on todettu laskevan ominaisenergiankulutusta ja parantavan massojen lujuusominaisuuksia (Setliff ym., 1990, Leatham ym., 1990 ja Akhtar ym., 1992). Haittapuolina näissä valkolahottajasiementikäsittelyissä on niiden vaatima pitkä käsittelyaika (useimmiten viikkoja), alentunut saanto (85 - 95 %), prosessin vaikea säädettävyys ja huonontuneet optiset ominaisuudet.

Yleensä erilaiset tunnetun tekniikan mukaiset entsyymikäsittelyt on tehty puuraaka-aineelle, jolle valmistusprosessin aikana on jo suoritettu jonkinasteinen kuidutus. Suoraan hakkeelle tehtynä entsyymikäsittely ei yleisen käsityksen mukaan ole yhtä tehokas, koska entsyymivalmistetta on vaikea saada imeytymään tehokkaasti hakkeen muodossa olevan raaka-aineen kuituihin. Natiivissa hakemuodossa puuraaka-aineen pinta-alaa ei ole riittävästi niin että entsyymikäsittely tapahtuisi tehokkaasti. Toinen syy on se, että suuri osa puun huokosista on liian pieniä vastaanottamaan entsyymimolekyylejä (Grethlein, H.E. Biotechnology, February 1985, pp.155 - 160).

Tunnetun tekniikan mukaisesti sellunkeitossa käytettävään hakkeeseen saadaan keittoliuos tunkeutumaan käsittelemällä haketta paineiskuilla keittoliuoksen läsnäollessa. Esimerkiksi Vilamo-menetelmässä haketta käsitellään keittoliuoksen läsnäollessa vaihtelemalla painetta 4,5 kp/cm² paineesta ja 10-16 s käsittelyajasta paineeseen 2 kp/cm² ja käsittelyaikaan 5-6 s, käsittely toistetaan 6-8 kertaa, 1 minuutin inter-vallein (Rydholm, 1965).

Patenttihakemuksessa WO 95/09267 on ehdotettu sellunkeitossa käytettävän hakkeen käsittelyä kemiallisella liuoksella saattamalla hake vakuumiin ja viemällä kemiallinen liuos paineiskulla puun kuituihin. Kemiallinen liuos voi hakemuksen mukaan olla keittoliuos, joka sisältää esimerkiksi katalyyttejä ja entsyymejä. Keksinön tavoitteena on ollut saada ligniinin määrää vähennettyä, jotta jäännösligniinin vähentämisen tarve keiton loppuvaiheessa pienenesi. Hakemuksessa ei kuitenkaan lähemmin kuvata, saadaanko entsyymit puun solukkoon ja onko entsyymeillä mitään vaikutusta ligniinin määrän vähenemiseen.

US-patentissa 5,374,555 on ehdotettu ligniinin poistoa lignoselluloosamateriaalista proteaasientsyymien avulla. Entsyymikäsittelyn tehostamiseksi on ehdotettu hakkeen mekaanista käsittelyä esimerkiksi ruuvipuristimessa. Patenttijulkaisussa on mainittu, että

sellulaasia voidaan käyttää hakkeen tai massan esikäsittelyentsyyminä, mutta sellulaasikäsittelyä ei ole ehdotettu tehtäväksi mekaanisen käsittelyn yhteydessä. Patentissa ei ole ollut tarkoituksena energian säästö vaan ligniinin poisto, eikä energiataloudesta ole tehty mitään havaintoja. Vaikka hakemuksessa ehdotetaan proteaasikäsittelyä sekä mekaanisessa massan valmistuksessa että kemiallisessa massan valmistuksessa käytettävän puumateriaalin käsittelemiseksi, kyseessä on lähinnä ollut ligniinin poisto kemiallisen massan valmistuksen esikäsittelynä.

Patenttihakemuksessa WO 97/40194 on ehdotettu puun rakenteen tai koostumuksen muuttamista lisäämällä paineen avulla puristettuun hakkeeseen sieni- tai bakteeriviljelmiä, tai näistä saatuja tuotteita kuten entsyymejä. Puristuksen tarkoituksena on aikaansaada puuhun säröjä ja halkeamia. Kun hake päästetään puristuksesta, mikrobit tai niiden tuotteet imeytyvät hakkeen laajentuessa puun rakenteisiin osittain alipaineen osittain kapillaari-ilmiön ansiosta. Hakemuksessa on ehdotettu mm. sieniä suvuista *Ceriposiopsis*, *Phanerochaete* ja *Ophiostoma*. Entsyymeistä on mainittu lipolyttiset, proteolyttiset, ligninolyttiset, sellulolyttiset ja hemisellulolyttiset entsyymit. Patenttijulkaisussa kuvattiin entsyymivalmisteen Clariant Cartazyme HSTM (ksylanaasi) imeyttäminen puristettuun hakkeeseen paineen vapauttamisen jälkeen. Käsittelyn jälkeen neste poistettiin ja hakkeesta valmistettiin mekaanista massaa. Energiaa kului tällöin 7,5 % vähemmän kuin pelkällä puskurilla käsiteltyllä hakkeella. Toisessa kokeessa käsittelyt tehtiin entsyymivalmisteilla Clariant Cartazyme NSTM (ksylanaasi) ja Sigma porcine pancreas Lipase L-3126. Energiaa kului tällöin 12,5 % vähemmän kuin pelkällä puskurilla käsiteltäessä. Julkaisussa ei ollut mainintaa massan optisten ominaisuuksien säilymisestä. Paras energiansäästö saavutettiin julkaisun mukaan yhdistämällä eri lähteistä peräisin olevia entsyymivalmisteita, joista erityisesti nisäkäspräisen lipaasin määrä oli huomattavan suuri. Muidenkin käytettyjen entsyymien määrä oli varsin korkea, mikä antaa aiheen epäillä, ettei energiansäästöä saavutettu erityisen taloudellisesti.

Eriksson ja Heitman (1998) kuvasivat kokeita, joissa puupalasia (kooltaan 1 x 1 x 1.5 tuumaa) käsiteltiin sellulaasientsyymiseoksella ja sen jälkeen palaset hierrettiin ja ja tutkittiin hiertämiseen kuluvaan energiaan. Entsyymiseoksen imeytymistä puupalasiin helpotettiin viemällä palaset vakuumiin. Käsittelyllä ei havaittu olevan vaikutusta hiertämisenergian kulutukseen.

- Tunnetuissa mekaanisen massan valmistuksen menetelmissä ongelmana on suuri energian kulutus. Kun jauhautuvuutta ja energiataloutta on pyritty parantamaan entsyymikäsittelyjen avulla, ei energiansäästöä juurikaan ole saavutettu ja tuloksena on usein ollut massan lujuusominaisuuksien heikkeneminen (sellulaasikäsittely) tai massan tummuminen ja optisten ominaisuuksien heikkeneminen (lakkaasikäsittely). Lisäksi entsyymiliuosta ei aina ole tehokkaasti saatu vaikuttamaan puuainekseen. Joissakin tapauksissa kokeissa käytetyn entsyymikoostumuksen valmistaminen on saattanut sisältää aikaavieviä vaiheita ja/tai olla muuten epätaloudellista.
- 10 Esillä olevan keksinnön tarkoituksena on poistaa ainakin joitain tunnetun tekniikan epäkohtia ja saada aikaan parannettu menetelmä mekaanisen massan valmistamiseksi. Tarkemmin sanoen keksinnön tarkoituksena on ollut tarjota hakkeen esikäsittelymenetelmä käytettäväksi ennen mekaanisen massan valmistusta.
- 15 Esillä olevassa keksinnössä on yllättäen havaittu, että haketta voidaan esikäsitellä entsyymivalmisteella, jossa on synergistisesti vaikuttavia entsyymiaktiivisuuksia. Entsyymivalmisteen ei tällöin tarvitse ainoastaan sisältää tiettyä, eristettyä entsyymiaktiivisuutta, vaan entsyymivalmisteenä voidaan käyttää suoraan erilaisia entsyymiaktiivisuuksia sisältävää entsyymivalmistetta.
- 20 Menetelmän mukainen käsittely voidaan kohdistaa suoraan hakkeeseen. Jauhatusenergian säästö on tällöin mahdollisimman suuri, koska entsyymikäsittely tapahtuu massanvalmistuksen varhaisessa vaiheessa.
- 25 Esillä olevan keksinnön menetelmän mukaisesti hake esikäsitellään entsyymillä, joka kykenee hajottamaan puun rakenneosia, minkä jälkeen hakkeesta valmistetaan mekaanista massaa hiertämällä. Entsyymikäsittely on edullista suorittaa puristamalla haketta kokoon ja saattamalla kokoonpuristettu hake nestefaasissa kosketuksiin entsyymikoostumuksen kanssa entsyymikoostumuksen imeyttämiseksi hakkeeseen. Entsyymikoostumus sisältää edullisesti sekä sellobiohydraalasia että endoglukanaasia. Erityisen edullista on, että
- 30 koostumus sisältää tehokkaan määrän kumpaakin, sekä sellobiohydraalasia että endoglukanaasia. Edullisia ovat entsyymikoostumukset, jotka sisältävät sellobiohydraalasia ja endoglukanaasia suhteessa 20:1 – 1:20 proteiinien painosuhteena ilmoitettuna.

Endoglukanaasin määrä verrattuna sellobiohydraasin määrään on keksinnön joidenkin edullisten sovellusmuotojen mukaisesti suurempi kuin mitä teolliset sellulaasin tuotokannat, kuten *Trichoderma*, luonnostaan tuottavat kasvuliukoiseensa.

- 5 Tässä tarkemmin sanottuna keksinnön mukaiselle menetelmälle on pääasiallisesti tunnusomaista se, mikä on esitetty patenttivaatimuksen 1 tunnusmerkkiosassa.

Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista myös se, mikä on esitetty patenttivaatimuksen 17 tunnusmerkkiosassa.

10

Keksinnön avulla saavutetaan useita huomattavia etuja. Käytettäessä keksinnön edullisten sovellusmuotojen mukaisia menetelmiä energiaa kuluu huomattavasti vähemmän kuin tunnetun tekniikan mukaisissa menetelmissä. Energiansäästö voi olla jopa 20 % verrattuna menetelmään, jossa haketta ei käsitellä entsyymivalmisteella.

15

Käsiteltäessä haketta keksinnön edullisten sovellusmuotojen mukaisilla menetelmillä massan lujuudet eivät heikkenet, vaan jopa paranivat. Myös optiset ominaisuudet pysyivät hyvinä. Käsiteltäessä haketta keksinnön edullisten sovellusmuotojen mukaisilla menetelmillä massan laatua pystyttiin siis parantamaan.

20

Tunnetun tekniikan mukaisesti kuidutettavan aineen käsittely ei-optimoidun sellulaasi-entsyymituotteen avulla johti liukenemattoman selluloosan hydrolysoitumiseen ja siten massan lujuusominaisuuksien heikkenemiseen. Tässä keksinnössä on yllättäen havaittu, että sellobiohydraasia ja endoglukanaasia sisältävä entsyymivalmiste ei välttämättä

25

aiheuta massan lujuuksien menetystä.

30

Keksinnön edullisten sovellusmuotojen mukaisesti entsyymivalmiste tuotetaan sellaisessa isäntäorganismissa, joka erittää entsyymivalmisteen ulos solusta, jolloin entsyymivalmistetta ei tarvitse eristää solusta. Erittäin edullista on myös käyttää tuottajaisäntänä geneettisesti modifioitua organismia, joka tuottaa suoraan kasvuliukoiseen halutunlaista entsyymivalmistetta. Tästä on se huomattava etu, että käytettävää entsyymiaktiivisuutta ei tarvitse eristää isäntäorganismista tai sen kasvuliukoisesta, vaan voidaan käyttää suoraan esimerkiksi isäntäorganismin kasvuliukoista.

Keksintöä kuvataan seuraavassa yksityiskohtaisen selostuksen ja muutamien esimerkkien avulla, joiden tarkoituksena ei ole kuitenkaan rajoittaa keksinnön suojapiiriä.

Selluloosan modifiointiin ja hajotukseen osallistuvista entsyymeistä käytetään yhteisnimitystä "sellulaasit". Näitä entsyymejä ovat endo- β -glukanaasit, sellobiohydrolaasit ja β -glukosidaasi. Hyvin monet organismit, kuten erilaiset lahottajasienet, homeet ja anaerobiset bakteerit tuottavat joitakin mainituista entsyymeistä tai niitä kaikkia. Organismien ja kasvatusolosuhteiden mukaan kyseisiä entsyymejä erittyy solun ulkopuolelle vaihtelevissa suhteissa ja määrissä.

Tässä hakemuksessa käytetyllä termillä "entsyymivalmiste" tarkoitetaan mitä tahansa sellaista tuotetta, joka sisältää ainakin yhden entsyymin tai entsyymin rakenneosan. Niinpä entsyymivalmiste voi olla esim. entsyymiä tai entsyymejä sisältävä kasvatusliuos, eristetty entsyymi tai kahden tai useamman entsyymin seos. "Sellulaasi" tai "sellulaasientsyymivalmiste" tarkoittaa puolestaan entsyymivalmistetta, joka sisältää ainakin yhden edellä mainituista sellulaasientsyymeistä. "Entsyymikoostumus" tarkoittaa tässä hakemuksessa samaa kuin entsyymivalmiste. Entsyymivalmiste tai entsyymikoostumus voi sisältää entsyymien lisäksi myös esimerkiksi puskureita, stabilaattoreita, säilöntäaineita tai muita tarvittavia apuaineita.

"Sellobiohydrolaasiaktiivisuudella" tarkoitetaan tässä hakemuksessa aktiivisuutta, joka kykenee modifioimaan selluloosan kiteisiä osia. Sellobiohydrolaasi I ja II -aktiivisuudet tarkoittavat *Trichoderma* tuottamia sellobiohydrolaasin pääaktiivisuuksia tai jonkin toisen organismin tuottamia vastaavia aktiivisuuksia. Endoglukanaasiaktiivisuudella tarkoitetaan tässä hakemuksessa aktiivisuutta, joka kykenee modifioimaan selluloosan amorfisia osia. Endoglukanaasi I- ja endoglukanaasi II-aktiivisuudet tarkoittavat *Trichoderma* tuottamia endoglukanaasin pääaktiivisuuksia tai jonkin toisen organismin tuottamia vastaavia aktiivisuuksia.

Entsyymivalmisteella, joka sisältää "tehokkaan määrän" sellobiohydrolaasia ja endoglukanaasia tarkoitetaan entsyymivalmistetta, jossa molempien entsyymien vaikutus hakkeeseen on mitattavissa jauhatuksen energiankulutuksen pienenemisenä. Tehokas määrä sellobiohydrolaasia ja endoglukanaasia saa aikaan vähintään 3 %, edullisesti vähintään 5 %,

edullisemmin ainakin 8 %, edullisimmin ainakin 10 % energiankulutuksen pienenemisen jauhamisessa.

- Keksinnön mukaisiin menetelmiin voidaan haluttaessa yhdistää muilla entsyymeillä, kuten
- 5 hemisellulaaseilla (esim. ksylanaasit, glukuronidaasit ja mannanaasit) tai esteraaseilla suoritettuja käsittelyitä. Edellä mainittujen lisäksi esillä olevissa menetelmissä voidaan lisäentsyyminä käyttää β -glukosidaasiaktiivisuuden omaavaa valmistetta, koska tällainen glukosidaasiaktiivisuus estää sellobioosin aiheuttaman lopputuoteinhibition.
- 10 Sellobiohydraasi- ja endoglukanaasientsyymivalmisteet valmistetaan kasvattamalla sopivia mikro-organismikantoja, joiden tiedetään tuottavan sellulaasia. Edullisesti kannat ovat teollisesti käytettäviä tuottokantoja. Kasvatusalustana käytetään esimerkiksi yksinkertaista selluloosa-alustaa (1 % Solka floc), johon on lisätty tarvittavat hivenaineet (Mandels ja Weber, 1969). Tuottokantoina voidaan käyttää bakteereja, homeita ja sieniä. Esimerkkeinä
- 15 mainittakoon seuraaviin sukuihin kuuluvat mikro-organismit:

Trichoderma (esim. *T. reesei*), *Aspergillus* (esim. *A. niger*), *Phanerochaete* (esim. *P. chrysosporium*; Covert ym., 1992), *Penicillium* (esim. *P. janthinellum*, *P. digitatum*), *Streptomyces* (esim. *S. olivochromogenes*, *S. flavogriseus*), *Humicola* (esim. *H. insolens*) ja

20 *Bacillus* (esim. *B. subtilis*, *B. circulans*, Ito ym., 1989). Voidaan käyttää myös muitakin valkolahottajiin kuuluvia sieniä, esim. *Phlebia*-, *Ceriporiopsis*-, *Trametes*- sukuihin kuuluvia lajeja.

Sellobiohydraaseja, endoglukanaaseja tai niiden rakenneosia on mahdollista tuottaa

25 kannoilla, jotka on geneettisesti parannettu tuottamaan juuri näitä proteiineja tai muilla geneettisesti parannetuilla tuottoisännillä, joihin näitä proteiineja koodaavat geenit on siirretty. Kun halutun proteiinin geenit on kloonattu (Teeri ym., 1983), on proteiinia tai sen osaa mahdollista tuottaa halutussa isännässä. Haluttuna isäntänä voi olla esimerkiksi

Trichoderma -home (EP 244 234, Mitsuishi ym., 1990), hiiva (Penttilä ym., 1988), jokin

30 toinen home, esim. *Aspergillus* -suvusta (van den Hondel ym., 1992), bakteeri tai mikä tahansa muu genetiikaltaan riittävästi tunnettu mikro-organismi.

Keksinnön edullisten sovellusmuotojen mukaan haluttu sellobiohydraasi ja endoglukanaasi tuotetaan *Trichoderma* -homekannan, edullisesti *T. reesei* -kannan avulla.

Sanottu kanta on yleisesti käytetty tuotto-organismi ja sen sellulaasit tunnetaan kohtuullisen hyvin. *T. reesei* syntetisoi kahta sellobiohydrolaasia, joista seuraavassa käytetään lyhenteitä CBH I ja CBH II, useita endoglukanaaseja, joista EGI ja EGII ovat pääaktiivisuudet ja ainakin kahta β -glukosidaasia (Chen ym., 1992). Entsyymien biokemiallisia ominaisuuksia on runsaasti kuvattu erilaisilla, puhtailla selluloosasubstraateilla. Endoglukanaasit ovat tyypillisesti aktiivisia liukoisilla ja amorfisilla substraateilla (CMC, HEC, β -glukaani), sen sijaan sellobiohydrolaasit pystyvät hydrolysoimaan kiteistä selluloosaa. Sellobiohydrolaasit toimivat keskenään selkeän synergistisesti kiteisellä selluloosalla, mutta niiden hydrolyysimekanismi on oletettavasti erilainen. Nykyiset käsitykset sellulaasien toimintamekanismeista perustuvat puhtailla sellulaasipreparaateilla saatuihin tutkimustuloksiin, eivätkä ne ole yleispäteviä tapauksissa, joissa substraatti sisältää myös muita komponentteja, kuten esim. ligniiniä tai hemiselluloosaa.

*T. reesei*in sellulaasit (sellobiohydrolaasit ja endoglukanaasit) eivät juurikaan eroa toisistaan optimaalisten toimintaolosuhteiden, esim. pH:n ja lämpötilan, suhteen. Sen sijaan ne eroavat toisistaan puuraaka-aineen selluloosaa hydrolysoivan ja modifioivan kykynsä perusteella.

Myös sellobiohydrolaasit I ja II eroavat toisistaan jossain määrin aktiivisuuksien osalta, samoin endoglukanaasit I ja II. Tämän keksinnön edullisissa sovelluksissa näyttää kuitenkin sellobiohydrolaasien suhde endoglukanaaseihin olevan tärkeämpi kuin eri sellobiohydrolaasien tai eri endoglukanaasien keskinäinen suhde.

Trichoderma reesei tuottaa luonnostaan kasvuliuokseen eri sellulaasikomponentteja, joiden määrä ja keskinäinen suhde riippuu käytetystä tuottokannasta ja kasvatusoloista. Villityypin *Trichoderma reesei*lla pääsellulaasien suhteelliseksi määräksi painoprosentteina on esitetty seuraavia: CBH I 60%, CBH II 20%, EG I 10% ja EG II 10% (Ståhlberg, 1991). Sellobiohydrolaasien ja endoglukanaasien suhde on tällöin noin 4:1.

Tässä keksinnössä on havaittu, että keksinnön mukaisessa menetelmässä edullisia entsyymiseoksia ovat sellaiset, joissa on sekä sellobiohydrolaasientsyymejä että endoglukanaasientsyymejä. Vaikka emme haluakaan sitoutua mihinkään, teoriaan, vaikuttaa vahvasti siltä, että keksinnön mukaisessa menetelmässä tarvitaan sekä sellobiohydrolaasi- että endoglukanaasientsyymeitä siksi, että endoglukanaasi kykenee

valmistelemaan hakkeessa kohteita, joihin sellobiohydraasi pääsee vaikuttamaan. Koska kumpikaan aktiivisuus ei yksinään saa haluttua vaikutusta aikaiseksi, sellobiohydraasien ja endoglukanaasien pitää toimia synergiaassa. Sellobiohydraasien suhde endoglukanaaseihin on keksinnön edullisten sovellusmuotojen mukaisesti proteiinien painosuhteena ilmaistuna edullisesti 20: 1 – 1: 20, edullisemmin 9:1 – 1: 9, vielä edullisemmin 5:1 – 1:5, edelleen edullisemmin 3:1 – 1:3, suositeltavimmin 2:1 – 1:2, ja edullisimmin noin 1:1. Kaikkein edullisimpia sellulaasikoostumuksia ovat siis sellaiset koostumukset, joissa sellobiohydraasien ja endoglukanaasien painosuhte on lähellä 1:1. Energiansäästöefekti voidaan kuitenkin saada aikaan tästä poikkeavallakin painosuhteella, mikäli käytetty endoglukanaasi on aktiivisuudeltaan hyvin voimakas, niin että jo pienikin määrä riittää aikaansaamaan halutun efektin.

Keksinnön edullisten sovellusmuotojen mukainen on myös sellainen entsyymivalmiste, jossa endoglukanaasien osuus valmisteessa on 2 – 60 p-%. Vielä edullisempi on valmiste, jossa endoglukanaasien osuus valmisteessa on 20 – 55 p-% ja edullisin sellainen, jossa endoglukanaasien osuus on 45 – 50 p-%. Tällainen endoglukanaasien määrä voidaan saavuttaa lisäämällä joko EGI:n tai EGII:n tai näiden molempien määrää valmisteessa. Jos pelkästään EGI:n määrää lisätään, EGI:n määrä pitää saada valmisteessa nousemaan tasolle 15 – 45 p-%. Samoin, jos pelkästään EGII:n määrää lisätään.

Esimerkiksi US-patentissa nro 5,874,293 kuvataan entsyymivalmiste, joka on tuotettu EGII ylituottavalla *Trichoderma*-kannalla (ALKO 3529). Kannan tuottamassa kasvuliuoksessa on suhde CBH:EG arvioitu olevan 1-1.4:1. Esimerkiksi tällaisen kannan tuottamaa kasvuliuosta olisi edullista käyttää esillä olevassa keksinnössä. Julkaisussa Karhunen et al. (1993) kuvataan *Trichoderma*-isäntä, joka on modifioitu ylituottamaan EGI-entsyymiä. Myös tällaisen isännän kasvuliuosta voitaisiin käyttää esillä olevassa keksinnössä. Yleisesti ottaen edullisia entsyymiseoksia tämän keksinnön edullisten sovellusmuotojen mukaan ovat sellaiset, joissa endoglukanaasin määrä on korkeampi kuin mitä sellulaaseja tuottavat mikro-organismit, kuten esimerkiksi *Trichoderma*, erityisesti *T. reesei*, tuottavat luonnostaan kasvuliukseensa.

Modifioidulla sellulaasivalmisteella tarkoitetaan tässä valmistetta, jossa CBH- ja EG-komponenttien suhdetta on muutettu keskitason ammattimiehen hyvin tuntemilla menetelmillä. Tällaisia menetelmiä ovat esimerkiksi isäntäorganismin geneettinen modi-

fiointi siten, että isäntäorganismi tuottaa uudenlaista sellulaasiyhdistelmää kasvuliukseensa. Muita mahdollisia tapoja valmistaa modifioituja sellulaasivalmisteita on sellulaasia sisältävän kasvuliuksen fraktiointi tai erilaisten sellulaasiseosten yhdistäminen.

- 5 Isäntäorganismi voidaan geneettisesti modifioida tuottamaan haluttuja sellobiohydrolaaseja ja endoglukanaaseja toivotussa suhteessa. Esimerkiksi *Trichoderma*-suvun kantojen geneettinen modifiointi voidaan tehdä patentissa EP 244 234 tai julkaisussa Suominen ym., 1993 kuvatuilla menetelmillä. Edullisia entsyymivalmisteita käytettäväksi tämän keksinnön sovellusmuodoissa ovat esimerkiksi sellaiset, joissa *T. reesei*-home on modifioitu
- 10 ylituottamaan EG I ja/tai EG II-entsyymejä. Ylituottoisäntää on saatettu modifioida myös siten, että se tuottaa vähemmän tai ei ollenkaan joitain sellobiohydrolaasiaktiivisuuksia, etenkin CBH I tai CBHII-aktiivisuuksia, tai että se tuottaa vähemmän tai ei ollenkaan endoglukanaaseja, etenkin EG I ja/tai EG II-aktiivisuuksia. On kuitenkin huomattava, että keksinnön edullisten sovellusmuotojen mukaisissa entsyymivalmisteissa tulee olla
- 15 sellobiohydrolaasiaktiivisuuksia, joten endoglukanaasiaktiivisuuksien lisääminen entsyymivalmisteisiin on edullisempaa kuin sellobiohydrolaasiaktiivisuuksien vähentäminen tai endoglukanaasien poistaminen.

Vastaavanlaisia entsyymivalmisteita voidaan valmistaa myös puhdistamalla sopivia sellobiohydrolaasi- ja endoglukanaasientsyymejä ja yhdistämällä näitä edullisissa suhteissa tai lisäämällä modifioimattoman isännän tuottamaan entsyymivalmisteeseen haluttuja entsyymiaktiivisuuksia, esimerkiksi EGI- ja EGII-aktiivisuuksia.

- 25 EGI- ja EGII-entsyymejä ylituottamaan kykenevät kannat voidaan rakentaa esimerkiksi siirtämällä näitä entsyymejä koodaavat geenit (*egl1* Penttilä *et al.* 1986 ja *egl2* Saloheimo *et al.* 1988) valittuun *Trichoderma*-isäntään useana kopiona tai korvaamaan joitain *Trichoderman* geenejä, kuten sellobiohydrolaaseja koodaavia *cbh1*- ja *cbh2*-geenejä, kuten on kuvattu julkaisussa Suominen *et al.* (1993). Kyseiset geenit voidaan ekspressoidea voimakkaan *cbh1*-promoottorin alaisuudessa, kuten on kuvattu julkaisussa Paloheimo *et al.*
- 30 (1993).

Valmistettaessa geneettisesti modifioituja isäntiä, voidaan isäntinä käyttää esimerkiksi *T. reesei* kantaa QM6a, siitä erityisesti sellulaasin tuottoon kehitettyjä kantoja QM9414 ja Rut C -30 tai esimerkiksi näistä kehitettyjä vähemmän proteeasia tuottavia kantoja.

Esillä olevan keksinnön edullisten sovellutusmuotojen mukaan entsyymivalmiste valmistetaan isäntäorganismien avulla, joka on modifioitu tuottamaan kasvuliuokseensa sellobiohydraaseja ja endoglukanaaseja halutussa suhteessa. Vaihtoehtoisesti kasvuliuokseen, joka on tuotettu modifioimattomalla sellulaaseja kasvuliuokseensa luonnostaan tuottavalla isäntäorganismilla, lisätään endoglukanaasi I ja/tai II- entsyymejä, jotka on joko tuotettu näitä entsyymejä ylituottamaan modifioidulla mikro-organismilla tai eristetty ja mahdollisesti puhdistettu kasvuliuoksesta. Entsyymivalmisteen valmistamisessa voidaan myös yhdistellä yllämainittuja menetelmiä. Sellobiohydraasi ja endoglukanaasi voidaan erottaa tuottajaisännän kasvuliuoksista useilla tunnetuilla tavoilla. Näissä erotusmenetelmissä tyypillisesti yhdistetään useita erilaisia puhdistustekniikoita, kuten saostuksia, ioninvaihtokromatografisia ja affineettikromatografisia sekä geelikromatografisia menetelmiä.

Entsyymivalmisteet voidaan valmistaa *Trichoderma*- homeen tai jonkun muun tuottoisännän avulla. Sellobiohydraasia ja endoglukanaasia koodaavat geenit voivat olla peräisin *Trichoderma*sta tai jostain toisesta edullisia sellobiohydraasi- ja endoglukanaasiaktiivisuuksia tuottavasta isännästä ja entsyymivalmistuksessa kyseiset aktiivisuudet voivat olla samaa tai eri alkuperää.

Esillä olevan keksinnön mukainen käsittely suoritetaan hakkeelle. Puuraaka-aine hakeetaan normaaliin tapaan siten, että hakepalasten pituus on noin 15-25 mm. Ennen käsittelyä hake voidaan lajitella poistamalla siitä ylisuuret ja ylipaksut hakepalat sekä hienoaines.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä hakemateriaali puristetaan tyypillisesti kokoon ainakin 10 %, tavallisimmin 10 – 30 %, sen alkuperäisestä irtotilavuudesta (bulk volume). Haketta puristetaan suhteessa 1:2 – 1:10. Edullisesti käytetään puristussuhdetta, joka on ainakin 1:4. Puristuskäsittely suoritetaan edullisimmin menetelmällä, jossa haketta puristetaan kasaan ilman merkittävää kiertoliikettä, koska tavoitteena ei ole murskata hakepalaa vaan tehdä puuraaka-aineeseen mikrosäröjä. Teknisesti puristuskäsittely voidaan toteuttaa monilla tavoin esim. ruuvipuristimessa tai hydraulipuristimella. Puristuskäsittelyssä impregnoitua haketta käsitellään riittävä aika entsyymien toiminnalle otollisissa olosuhteissa, minkä jälkeen haketta prosessoidaan normaaliin tapaan ennen jauhatusta,

mukaanlukien esilämmitys höyryllä ennen syöttöä jauhimeen.

Keksinnön mukainen menetelmä ei ole rajoittunut tiettyyn puuraaka-aineeseen, vaan sitä voidaan soveltaa yleisesti sekä havu- että lehtipuille, kuten esimerkiksi *Pinaceae* -lahkon kasveille (esim *Picea*- ja *Pinus*- heimot), *Salicaceae* -lahkon kasveille (esim. *Populus* - heimo) ja *Betula* -heimon kasveille.

Kokoonpuristettu hake saatetaan kosketuksiin entsyymivalmisteen kanssa nestefaasissa. Parhaiten tämä tapahtuu siten, että hakkeen puristus tapahtuu entsyymiliuoksessa. Nesteen ja hakkeen suhde on edullista valita siten, että neste pääsee kunnolla vaikuttamaan hakkeeseen. Nesteen suhde hakkeeseen voi siten olla 10:1 – 2:1, sopivimmin se on 6-8:1. Puristuspaine voi olla 10 – 20 MPa, edullisesti se on 12 – 15 MPa. Puristus-imeytysvaiheen keston pitää olla ainakin 1 min, edullisesti kesto on 5 – 100 min, tavallisimmin 10 – 30 min. Puristuksen vapauttamisen jälkeen hakkeen annetaan palautua alkuperäiseen tilavuuteen entsyymiliuoksen alla, jolloin entsyymiliuos impregnoituu hakkeeseen.

Puristus-imeytysvaiheessa entsyymiliuoksen pH:n ja lämpötilan tulee olla entsyymivalmisteen toiminnalle sopiva. Sellobiohydraaseilla ja endoglukanaaseilla pH:n tulee olla mieluiten välillä pH 3 - 10, edullisesti pH 4 - 8 ja lämpötilan 20 – 55 °C, edullisesti 30 – 45 °C. Haketta käsitellään em. olosuhteissa riittävän pitkä aika, jotta entsyymi ehtii vaikuttaa hakkeeseen ennen jauhatusa. Käsitelyaika vaihtelee suuresti hakkeen ominaisuuksista (koko, paksuus), puulajista, puristuskäsittelystä, entsyymivalmisteesta, käyttöoloista jne. riippuen ja sopiva käsitelyaika on selvitettävä tapauskohtaisesti. Kustannusteknisesti mahdollisimman lyhyt aika on edullinen, mutta prosessiteknisesti estettä usean tunnin käsitelylle ei ole. Tyypillisesti käsitelyaika voi olla 1-24 h välillä, edullisesti 1- 12 h välillä.

Keksinnössä käytettävän entsyymivalmisteen määrä hakkeen käsittelyssä valitaan siten, että liuokseen vapautuneiden sokereiden määrä on edullisesti noin 0,1-1,0 % alkuperäisestä kuiva-aineesta. Sopiva annostus on kokonaisproteiinina määritettynä 0,1 - 7 mg proteiinia/g haketta, edullisesti 3 – 6 mg proteiinia/g haketta (kuiva-aineena).

Esillä olevassa keksinnössä mekaaninen massa valmistetaan hiertämällä entsyymikäsitelty hake suotautuvuusarvoon, joka oli edullisesti vähintään 100 ml CSF, edullisemmin 40- 80

ml CSF. Keksinnön mukaisella menetelmällä havaittiin yllättäen saatavan 13 %, edullisesti 15 % ja edullisimmin jopa 20 % energiansäästö.

Näyttäisi siltä, että esillä olevan keksinnön mukainen entsyymikäsittely on edullinen erityisesti yhdistettynä mekaanisen massan valmistukseen hierremenetelmällä ja hierrettäessä massa suotautuvuusarvoon, joka on 100 CSF tai tätä pienempi.

Keksinnön avulla saavutetaan huomattavia etuja. Niinpä sen avulla voidaan merkittävästi vähentää hierrätyksen ominaisenergiankulutusta; kuten alla esitettävät esimerkit osoittavat, päästään keksinnön edullisten sovellusmuotojen mukaan jopa 20 % alempaan energiankulutukseen kuin käsittelemättömillä lähtöaineilla. Sopivalla entsyymivalmistella voidaan myös massan ominaisuuksia parantaa. Keksinnön edullisten sovellusmuotojen mukaisilla ratkaisuilla saadaan mekaanisen massan valmistuksessa hiertämällä korkea saanto, massan laatu on hyvä, lujuudet säilyvät, optiset ominaisuudet ovat hyvät ja menetelmän liittäminen nykyisiin prosesseihin on yksinkertaista.

Keksintöä voidaan soveltaa kaikissa mekaanisissa massanvalmistusmenetelmissä, kuten kuumahierteen (TMP) ja hierteen (RMP) valmistuksessa.

Keksintöä ryhdytään seuraavassa lähemmin tarkastelemaan muutaman ei-rajoittavan sovellutusesimerkin avulla.

Esimerkki 1

Hakkeen entsyymaattinen käsittely

Entsyymikäsittelyt sellulaasiseoksella suoritettiin lajitellulle kuusen pintapuuhakkeelle (Ø 7 mm) käyttäen entsyymiannosta 6,3 mg proteiinia/g haketta (kuiva-aineena) *Trichoderma* kannalla tuotettua kaupallista entsyymivalmistetta, jossa CBH:EG paino-osuuksien määritettiin olevan 1:1. Entsyymikäsittelyn tehostamiseksi hakkeeseen kohdistettiin puristuskäsittely käyttäen PREX-hydraulipuristinta. Hydraulipuristuksessa hake-erä (200 g) puristettiin alkuperäistä n. 20% pienempään tilavuuteen entsyymiliuoksessa käyttäen puristuspainetta 48t (14 Mpa). Neste:puusuhde oli 11:4 ja puristus-imeytysvaiheen kesto 10 min. Puristuksen vapauttamisen jälkeen hakkeen annettiin palautua alkuperäiseen

tilavuuteen entsyymiliuoksen alla, jolloin entsyymiliuos impregnoitui hakkeeseen.

Verrokkina oli muuten sama käsittely, mutta ilman entsyymiä. Puristuskäsittelyssä hakkeessa ei todettu visuaalisesti, eikä mik-roskooppisesti muutoksia. Puristuskäsittelyn jälkeen hake (+ puristusliuos) siirrettiin pyörivään ilmahaudekeittimeen jatkokäsittelyä varten. Käsittely suoritettiin ilman-paineessa ja lämpötilassa 45°C. Käsittelyliuokseen vapautuneiden hiilihydraattien määrä pelkistävinä sokereina määritettiin 6 ja 22h:n kuluttua. Saatua tulosta verrattiin käsittelyyn, jossa hakkeen puristuskäsittely jätettiin kokonaan pois. Tulokset on esitetty taulukossa 1.

- 10 Taulukko 1. Entsyymikäsittelyssä kuusen pintapuuhakkeesta liuokseen vapautuneiden hiilihydraattien määrä (6 h ja 22 h:n jälkeen). Liuenneiden hiilihydraattien määrä on laskettu prosentteina alkuperäisestä kuiva-aineesta.

<i>Käsittely</i>	<i>Liuenneet hiilihydraatit, % ka</i>	
	6 h	22 h
Puristuskäsittely	0,71	1,06
Ei puristuskäsittelyä	0,04	0,26

- 15 Tulosten perusteella todettiin puristuskäsittelyllä aikaansaadun entsyymin impregnoitumisen merkittävästi tehostaneen liukoisten hiilihydraattien vapautumista hakkeesta verrattuna tilanteeseen, jossa puristuskäsittelyä ei suoritettu.

Esimerkki 2

20

Entsyymikäsittelyn vaikutus hakkeen jauhautuvuuteen

Yhdistetyn puristus-imeytys- ja entsyymikäsittelyn vaikutuksia hakkeen jauhautuvuuteen tutkittiin siipijauhimmella. Kokeissa käytetty laitteisto sisälsi itse jauhimen ja siihen liitetyn tarkan energianmittausjärjestelmän. Siipijauhimen jauhinpesä koostui vastaterillä (20kpl) varustetusta lieriöstä ja pyörivästä roottorista, jossa oli neljä siipimäistä terää. Kutakin energian ominaiskulutuskäyrää (EOK) varten suoritettiin useita jauhatuksia (125 g ka/jauhatusta) muuttelamalla jauhatusaikaa (3- 12 min) ja siten myös jauhatuksen energiatasoa. Jauhatuksen kokonaisenergiankulutus saatiin kWh-mittarilta summaavan

25

pulssilaskurin avulla. Kuidutettua hakemäärää kohti saatu energiakulutusarvo korjattiin tyhjäkäyntikuormalla.

Käsitellyillä kuusipintahakkeella kuidutusajat olivat 3-12min. Käsittelety suoritettiin, kuten
 5 on esitetty esimerkissä 3 (45°C, 22 h). Puristus-imeytys-käsittelety suoritettiin käyttäen muokattua sellulaasiseosta kuten esimerkissä 1, CBH I:tä, ja EG-rikasta entsyymivalmistetta. Muokatulla seoksella annokset olivat 0,63 ja 6,3 mg proteiinia/g haketta (kuiva-aineena). CBH I ja EG-rikkaalla entsyymeillä annostus oli 5,0 mg proteiinia/g haketta (k-
 10 a). Vertailujauhatukset suoritettiin käsittelemättömälle hakkeelle, sekä hakkeelle, joka käsiteltiin muuten samoin kuin muut, mutta ilman entsyymiä (puskurikäsittelety). Jauhatuksen jälkeen massa poistettiin jauhimesta, suodatettiin, homogenoitiin ja määritettiin kuiva-ainepitoisuus, jonka perusteella voitiin laskea EOK-arvo (kWh/kg).

Tulokset on esitetty taulukossa 2.

15

Taulukko 2.

Käsittelety	CSF,ml	EOK, kWh/kg
Puskurikäsittelety (pH5)	100 ml	4,78
Sellulaasiseos, 0.63mg/g	"	4,15
Sellulaasiseos, 6,3 mg/g	"	3,79
CBH I, proteiini 5mg/g	"	4,94
EG-rikas, proteiini 5mg/g	"	4,14

Tulosten mukaan voidaan todeta, että hakkeen esikäsittelety muokatulla sellulaasiseoksella
 20 tehosti merkittävästi jauhautumista verrattuna muihin sellulaasivalmisteisiin (CBH I ja EG-rikas): käytetystä entsyymiannoksesta riippuen sellulaasiseoksella saavutettiin 10 - 20%:n energiansäästö verrattuna vastaavaan puskurikäsitteletyyn.

Esimerkki 3

25

Entsyymikäsitteletyn vaikutus massan arkkioinaisuuksiin

- Hake impregnoitiin ja käsiteltiin sellulaasiseoksella (annos 0,63 mg proteiinia/g haketta (k-a), 45°C, 22 h) kuten on esitetty esimerkissä 1. Tämän jälkeen hake jauhettiin siipijauhimmella esimerkin 2 mukaisesti. Jauhetuista massoista valmistettiin laboratorioarkit, jotka testattiin SCAN-menetelmien mukaisesti. Arkkiominaisuuksia on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3.

Käsit- tely	EOK, kWh/k g	CSF, ml	Tihe- ys, kg/m ³	Veto- ind., Nm/g	Repäi- syind. mNm ² /g	Scott Bond, J/m ²	Opasi- teetti, %	Vaale- us, %
Vertai- lu	4,61	115	361	38,5	8,24	112	94,5	54,4
Sellu- laasi	4,19	108	375	39,9	7,84	139	93,5	56,0

- 10 Tulosten mukaan hakkeelle tehty sellulaasikäsitteily paransi massan lujuusominaisuuksia, etenkin vetolujuutta ja z-suuntaista lujuutta (Scott Bond). Myös optiset ominaisuudet säilyivät hyvinä.

Kirjallisuus

- 15 Akhtar, M. Attridge, M. , Myers, G, Kirk, T.K. & Blanchette, R. Biomechanical pulping of loblolly pine with different strains of the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. TAPPI J. 75 (1992), 105-109.
- Chen, H., Hayn, M. & Esterbauer, H. Purification and characterization of two extracellular β -glucosidases from *Trichoderma reesei*, Biochim. Biophys. Acta 1121 (1992), 54-60.
- 20 Covert, S., Vanden Wymelenberg, A. & Cullen, D., Structure, organisation and transcription of a cellobiohydrolase gene cluster from *Phanerochaete chrysosporium*, Appl. Environ. Microbiol. 58 (1992), 2168-2175.

- Eriksson, L.A. & Heitman, J.A. Jr. Enzyme treatment of wood chips for mechanical pulping and the resulting effects on wood and fiberultrastructure. 7 th Int. Conf. Biotechnol. Pulp Pap. Ind., 1998, Volume B, B25-B28.
- Goring, D.A. . Thermal Softening of Lignin, Hemicellulose and Cellulose. Pulp And Paper Magazine of Canada 64 (1963) 12, T517-27.
- Grethlein, H.E. Biotechnology, February 1985, pp.155 - 160.
- Ito, S., Shikata, S., Ozaki, K., Kawai, S., Okamoto, K., Inoue, S., Takei, A., Ohta, Y. & Satoh, T., Alkaline cellulase for laundry detergents: production by *Bacillus sp.* KSM-635 and enzymatic properties, Agril. Biol. Chem. 53 (1989), 1275-1281
- Jokinen, K. & Savolainen, M. Puun mekaanisen massan käsittely lakkaasilla. PSC Communications 18. Espoo 1991.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 (1970), 680-685.
- Leatham, G., Myers, G. & Wegner, T. Biomechanical pulping of aspen chips: energy savings resulting from different fungal treatments. TAPPI J. 73 (1990), 197-200.
- Mitsuishi, Y., Nitisinprasert, S., Saloheimo, M., Biese, I., Reinikainen, T., Clayssens, M., Keränen, S., Knowles, J. & Teeri, T. Site-directed mutagenesis of the putative catalytic residues of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I and endoglucanase I, FEBS Lett. 275 (1990), 135-138.
- Paloheimo, M. , Miettinen-Oinonen, A., Torkkeli, T., Nevalainen, H. and Suominen, P. Enzyme production by *Trichoderma reesei* usingg the cbh1 promoter. Proceedings of the second TRICEL symposium on *Trichoderma reesei* cellulases and other hydrolases, Espoo, Finland, 1993, ed. by P. Suominen & T. Reinikainen, Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research & (1993):229-238.
- Penttilä, M., Antre, L., Lehtovaara, P., Bailey, M., Teeri, T. & Knowles, J. Effecient secretion of two fungal cellobiohydrolases by *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 63 (1988) 103-112.

- Pommier, J-C, Fuentes, J-L & Goma, G. Using enzymes to improve the process and the product quality in the recycled paper industry. Part 1: the basic laboratory work. TAPPI J. 72 (1989) 6, 187-191.
- 5 Pommier, J-C, Goma, G., Fuentes, L-C, Rousser, C. & Jokinen, O. Using enzymes to improve the process and the product quality in the recycled paper industry. Part 2: Industrial applications. TAPPI J. 73 (1990) 12, 197-202.
- Rydholm, S. Pulping Processes, Interscience Publishers, London, 1965.
- Setliff, E., Marton, R., Granzow, G. & Eriksson, K.. Biochemical pulping with white-rot fungi. TAPPI J. 73 (1990), 141-147.
- 10 Ståhlberg, J. Functional organization of cellulases from *Trichoderma reesei*. PhD Thesis. Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science, No. 344, Uppsala, 1991.
- Suominen, P. et al., 1993. High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. II Effects of deletions of individual cellulase genes. Mol. Gen. Genet. 241: 523-530.
- 15 Teeri, T., Salovuori, I. & Knowles, J., The molecular cloning of the major cellobiohydrolase gene from *Trichoderma reesei* Bio/Technology 1 (1983), 696-699.
- Tomme, P., McCrae, S., Wood, T. & Claeyssens, M. Chromatographic separation of cellulolytic enzymes. Methods Enzymol. 160 (1988), 187-193.
- 20 van den Hondel, C., Punt, P. & van Gorcom, R. Production of extracellular proteins by the filamentous fungus *Aspergillus*. Antonie van Leeuwenhoek 61 (1992), 153-160
- van Tilbeurgh, H. Bhikhabhai, R. Pettersson, L. and Claeyssens M. (1984) Separation of endo- and exo-type cellulases using a new affinity method. FEBS Lett. 169, 215-218.
- Virkola, Nils-Erik (Toim.) Puumassan valmistus. Suomen Paperi-insinöörien yhdistys. Turku 1983.

Zurbriggen, B.Z., Bailey, M.J., Penttilä, M.E., Poutanen, K. and Linko M. (1990) Pilot scale production of a heterologous *Trichoderma reesei* cellulase in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biotechnol. 13, 267-278.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä mekaanisen massan valmistamiseksi, jonka menetelmän mukaan
 - puuraaka-aine haketetaan,
 - hake esikäsitellään entsyymillä, joka kykenee hajottamaan puun rakenneosia,
 - 5 minkä jälkeen
 - hakkeesta valmistetaan mekaanista massaa hiertämällä,t u n n e t t u siitä, että
 - entsyymikäsitely suoritetaan puristamalla haketta kokoon ja saattamalla
 - kokoonpuristettu hake nestefaasissa kosketuksiin entsyymivalmisteen kanssa, joka
 - 10 sisältää tehokkaan määrän sekä sellobiohydraasia että endoglykanaasia.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytetään entsyymivalmistetta, joka sisältää sellobiohydraaseja ja endoglykanaaseja proteiinien painosuhteessa 20:1 - 1:20, edullisesti painosuhteessa 9:1 - 1:9.
- 15 3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytetään entsyymivalmistetta, joka sisältää sellobiohydraaseja ja endoglykanaaseja proteiinien painosuhteessa 5:1 - 1:5, edullisesti painosuhteessa 3:1 - 1:3.
- 20 4. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytetään entsyymivalmistetta, joka sisältää endoglykanaaseja 2 - 60 p-%, edullisesti 20 - 55 p-%.
5. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että
- 25 entsyymivalmiste on tuotettu jollain teollisesti käytettävällä tuottokannalla.
6. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että entsyymivalmiste on tuotettu kannalla, joka kuuluu sukuun, joka on valittu joukosta *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Humicola*, *Phanerochaete*, *Streptomyces*, ja
- 30 *Bacillus*.
7. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että entsyymivalmistetta käytetään 0,1-7 mg proteiinia/g haketta, edullisesti 3 - 6 mg

proteiinia/g haketta (k-a).

8. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että massa hierretään suotautuvuuteen, joka on vähintään 100 ml CSF, edullisesti vähintään
5 noin 80 ml CSF.
9. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hake puristetaan kokoon ainakin 10 %.
- 10 10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hake puristetaan kokoon puristussuhteella, joka on 1:2 – 1:10.
11. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että puristuskäsittelyyn saatettavan hakkeen keskimääräinen hakepalasten koko on noin 15 – 25
15 mm.
12. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että puristuskäsittely suoritetaan ruuvi- tai hydraulipuristimessa.
- 20 13. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että entsyymivalmisteen annetaan vaikuttaa hakkeeseen ainakin noin 1 minuutti, edullisesti noin 5 – 100 minuuttia, ennen hierteen valmistamista.
14. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että
25 haketta höyrytetään ennen puristuskäsittelyä.
15. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mekaaninen massa valmistetaan TMP- tai RMP-menetelmällä.
- 30 16. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukaisen menetelmän käyttö paperimassaksi käytettävän mekaanisen massan valmistamiseksi.
17. Menetelmä puuhakkeen hiertämiseen perustuvan mekaanisen massanvalmistuksen energiankulutuksen vähentämiseksi, t u n n e t t u siitä, että puuhaketta käsitellään ennen

hiertämistä entsyymivalmisteella, joka sisältää sellobiohydraasi- ja endoglykanaasi-entsyymejä suhteessa 20:1 – 1:20, ja joka imeytetään hakkeeseen puristamalla tätä mekaanisesti kokoon ja saattamalla kokoonpuristettu hake kosketuksiin entsyymivalmisteen kanssa nestefaasissa.

5

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että haketta hierretään suotautuvuustasolle, joka on < 100 ml CSF, edullisesti < 80 ml CSF.

(57) Tiivistelmä:

L 6

- Keksintö koskee sellaista menetelmää puuhakkeen esikäsittelymiseksi, jolla voidaan alentaa mekaanisen massan ominaisenergiankulutusta ja parantaa kuituteknisiä ominaisuuksia. Käsittelyssä puuhake saatetaan nestefaasissa kosketuksiin
- 5 sellobiohydraasia ja endoglukanaasia sisältävän entsyymivalmisteen kanssa.